

29.10.2004

PA 1229619

THE UNITED STATES OF AMERICA**TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:****UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE****United States Patent and Trademark Office****September 28, 2004**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

APPLICATION NUMBER: 60/515,333**FILING DATE: October 29, 2003**

REC'D 18 NOV 2004

WIPO

PCT

**PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)**

**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**



N. Williams
N. WILLIAMS

Certifying Officer**BEST AVAILABLE COPY****BEST AVAILABLE COPY**

17698 U.S. PTO

PTO/SB/16 (08-03)

Approved for use through 7/31/2008. OMB 0651-0032

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(c).

Express Mail Label No. EV 224787622 US

INVENTOR(S)					
Given Name (first and middle [if any])		Family Name or Surname		Residence (City and either State or Foreign Country)	
Yoshiyuki		Kanai		Tokyo, Japan	
Additional inventors are being named on the _____ separately numbered sheets attached hereto					
TITLE OF THE INVENTION (500 characters max)					
A METHOD OF DIAGNOSING ALZHEIMER'S DISEASE					
Direct all correspondence to: CORRESPONDENCE ADDRESS					
<input type="checkbox"/> Customer Number: _____ OR <input checked="" type="checkbox"/> Firm or Individual Name Charles E. Miller DICKSTEIN SHAPIRO MORIN & OSHINSKY LLP Address 1177 Avenue of the Americas 41st Floor City New York State NY Zip 10036-2714 Country US Telephone (212) 835-1400 Fax (212) 997-9880					
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)					
<input checked="" type="checkbox"/> Specification Number of Pages		9		<input type="checkbox"/> CD(s), Number _____	
<input checked="" type="checkbox"/> Drawing(s) Number of Sheets		4		<input type="checkbox"/> Other _____ (specify): _____	
<input type="checkbox"/> Application Data Sheet. See 37 CFR 1.76					
METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT					
<input type="checkbox"/> Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27. <input type="checkbox"/> A check or money order is enclosed to cover the filing fees. <input checked="" type="checkbox"/> The Director is hereby authorized to charge filing fees or credit any overpayment to Deposit Account Number: 50-2215 <input checked="" type="checkbox"/> Payment by credit card. Form PTO-2038 is attached.					
FILING FEE AMOUNT (\$) 160.00 The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government. <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____					

15535 U.S. PTO
60/515333

102903

[Page 1 of 1]

Respectfully submitted,

Date October 29, 2003

SIGNATURE

TYPED OR

PRINTED NAME *for* Charles E. Miller

TELEPHONE

(212) 835-1430

REGISTRATION NO.
(if appropriate)

24,576

Docket Number:

E0400.0001

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

A method of diagnosing Alzheimer's disease

Background of the Invention

アルツハイマー病(AD)およびアルツハイマー型痴呆症(SDAT)は50歳台から発症し、加齢に従ってその発症頻度が増加する疾患である。特に本邦においては、2010年には全国民の1/4が70歳以上の高齢化社会を迎えるため、AD/SDATの増加が予測され、病態の進行によって国民生産性の低下および医療費負担の著しい増加を招来する。従って、早期診断によって病態の進行を阻止することが急務である。そのためには、血中又は脊髄液中にその病態特異的なマーカーを発見し、正確にそれを測定することが重要である。

病態特異的なマーカーの発見のために、すでに多くの試みが為されている。それらの物質としては、ニューロフィラメント重鎖、チューブリン、グリアルフィブリラリ-酸性タンパク質、S100タンパク質、タウタンパク質、ペーターアミロイドプレカーサーペプチド、ミエリン塩基性タンパク質、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどが挙げられ、さらにこれらの物質に対する自己抗体などの検索がなされてきた[1]。これらの検索は無効ではないが、特異性に欠けるため、高感度に検出することが困難である。以上のことから、ADおよびSDATに対し、特異性に富んだ簡易診断法が切に望まれるところである。

Summary of the Invention

本発明は、アルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症などの脳神経系疾患を特異的に検出する方法、及びこれらの疾患の診断法を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。そして、アルツハイマー患者等の血中の抗ヒストン H1 抗体及び抗ポリ ADP-リボース抗体を測定することにより、上記疾患を検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストン H1 に対する抗体を検出することを特徴とする、神経系疾患の検出方法。

本発明においては、生体試料として血液を使用することができる。また、神経

系疾患としては、アルツハイマー病 (AD)又はアルツハイマー型痴呆症 (SDAT) が挙げられるが、これらの疾患に限定されるものではない。AD 又は SDAT 患者の生体試料 (例えば血液) 中には、抗ポリ ADP-リボース抗体(抗 pADPR 抗体)、抗 H1 ヒストン抗体 (抗 H1 抗体) 又はこれらの両者が含まれており、その自己抗体のサブクラスは IgG1 及び IgG2 のいずれも存在する。これに対し、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の自己抗体のサブクラスは、IgG2 および IgG3 が主である。従って、IgG1 と IgG2 との比 (G1/G2 比) を測定することにより、その値を指標として被験患者が AD 又は SDAT であるのかを判断することができる。また、それらの再分類 (亜型) をも可能にする。

(2) ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストン H1 に対する抗体を検出することを特徴とする、神経系疾患の診断方法。

生体試料、神経系疾患の具体的内容は上記(1)記載の発明と同様である。また、本発明の診断方法においても、IgG1 と IgG2 との比を指標として診断することが可能である。

(3) ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 を含む、神経系疾患の診断又は検出用キット。

(4)ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 が固相に固定された、神経系疾患の診断又は検出用プレート。

上記キット及びプレートにおいて、神経系疾患は例えばアルツハイマー病又はアルツハイマー型痴呆症である。

Brief Description of the Drawings

図 1 a は、AD 患者における抗 pADPR 抗体および抗 H1 抗体の検出結果を示す図である。

図 1 b は、SLE 患者における抗 pADPR 抗体および抗 H1 抗体の検出結果を示す図である。

図 2 a は、AD 患者および SDAT 患者における抗 H1 抗体と抗 pADPR 抗体との相関関係を示す図である。

図 2 b は、SLE 患者における抗 H1 抗体と抗 pADPR 抗体との相関関係を示す図である。

Description of the Preferred Embodiments

最近 AD 患者の脳神経細胞、とりわけ星膠細胞（アストロサイト）の細胞核において、ADP-リボシル化活性の上昇[2]、およびヒストン H1 が星膠細胞膜に高発現されている[3]という報告がある。この二つの現象には密接な関係のあることが知られている。ADP-リボシル化反応は、主にタンパク質に生じる現象であり[4]、タンパク質の修飾反応として知られている。修飾される代表的なものがヒストン H1 である。H1 は、核クロマチン、およびその構成単位であるヌクレオソーム(NS)の凝縮のために重要な働きを演じている。その H1 が ADP-リボシル化されると、その度合いによってクロマチンがタイトになったり、ルーズになったりする[5]。このことは、遺伝子発現の調節に深く関わり、また DNA が発ガン物質などで切断された場合にそれを修復する作用を有することを意味する[6]。さらに、近い将来において、ADP-リボシル化反応は、加齢と細胞核クロマチンの機能的・形態的变化とも深く関わってくるものと考えられる。

本発明者は、ADP-リボシル化の延長反応で合成されるポリ ADP-リボース（「pADPR」という）が、塩基性タンパク質と荷電結合すると、マウスやウサギに抗ポリ ADP-リボース抗体（「抗 pADPR 抗体」という）を産生させることを初めて報告した[7]。さらに、ADP-リボシル化反応を受けたヒストンでウサギを免疫すると、抗ヒストン抗体と抗 pADPR 抗体が同時に産生され、未修飾ヒストンで免疫した場合と比べてはるかに強力な抗体が産生されることを見出した[8-9]。

以上のような本発明者の研究実績から、本発明者は AD 患者アストロサイト膜表面に発現されているヒストン H1 は ADP-リボシル化されている可能性が高いと想定し、AD 患者血中の抗ヒストン H1 抗体と抗 pADPR 抗体を測定するに至った。

一方、免疫学的な見地とは別に、脳の虚血などの血流障害後に生じる神経細胞の修復には、ポリ ADP-リボシル化が深く関与することが知られている[10]。この場合は、DNA 障害の修復のために ADP-リボシル化反応が過度に促進する結果、NAD が枯渇して細胞死を誘導し、脳の変性に加担することになる。このような脳の虚血・血流障害時に PARP（pADPR 合成酵素）の阻害剤を投与すると神経細胞死や変性を抑制できることから、PARP の阻害剤の開発が積極的に行われている[6]。これを裏付けるように、PARP のノックアウトマウスでは脳の血流障害に伴う神経細胞死が抑制されることが報告されている[11]。

以上を総括すると、AD では脳での ADP-リボシル化が促進し（最近では ADP-

リボシル化のターゲット分子はH1よりもPARPのほうが頻度が高いといわれている[12])、pADPRが脳に沈着することが予測される。加齢にともなう予想される脳関門の緩和は、pADPRの血中への漏洩をもたらし、ひいては免疫系に接触する機会を増加させることになり、ADにおいてpADPRに対する免疫応答を調べる理論的根拠は極めて高い。

Examples

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

方法

pADPRの合成と精製

本発明者が開発した方法[13]により、仔牛胸腺核を酵素源とし、nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)を基質としてpADPRを合成・精製した。pADPRの平均鎖長は30とした。この手法で精製されたポリマーに含まれるDNAやヒストンの割合は1%以下である。

ヒストンH1の精製

全ヒストンは本発明者が開発した方法[8]を用いた。

ヒト前骨髄性白血病細胞株HL60細胞核より全ヒストンを単離し、さらに陽イオンカラムHiTrap SP (Amersham Biosciences)を用い、酸性(pH3.5)条件下でNaClの濃度勾配によって全ヒストンからH1のみを分離した。

全ヒストンは、0.25M NaCl加25mM トリス緩衝液(pH7.4) (溶液A)に対して透析し、可溶化に成功した。従来、ヒストンは通常希塩酸または塩を含まない水溶液中でのみ溶解することが知られていたが、この状態では以下に述べるELISAの系でヒストンを固相に付着させる場合、付着率の低下をきたしていた。しかしながら、本発明において上記の溶液Aを使用することにより、ヒストンの固相への付着効率を高めることに成功した。なお、得られたH1標品に含まれるDNAの含有量は1%以下であった。

抗pADPR抗体測定法

抗pADPR抗体は、固相酵素抗体法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)にて測定した。

Immulon 2HB マイクロタイタープレートを固相とし、pADPR は溶液 A で 1 $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、各ウェルに 50 μl 加え 4°C で一昼夜静置した。その後、TBS (25mM トリス, 140mM NaCl, 0.04% 窒化ソーダ (NaN_3), pH7.4) で洗浄し、次いで 2% スキムミルク含有 TBS にて室温で 1 時間反応させ、抗原未吸着部位を遮蔽した。最後に TBS で 3 回洗浄し、ELISA 用抗原プレートを作製した。

血清希釈は 200 倍とし、希釈反応液は、1% 牛血清アルブミン (BSA)、0.4% スキムミルク、および 0.02% NaN_3 を含有する TBS にて行った。

二次抗体には、アビジン標識抗ヒトサブクラス (G1, G2, G3, G4) 特異的抗体 (Zymed 社) を使用した。また、第三次試薬としてアルカリフォスファターゼ標識ビオチン (Zymed 社) を用い、発色用基質にはパラニトロフェニールホスフェイトを用いた。抗体価は A405 で表した。

抗ポリ H1 抗体測定法

抗ポリ H1 抗体の測定は、使用する抗原を H1 としたこと以外は、抗 pADPR 抗体測定法に準じて行った。

検体

6 例の AD および 20 例の SDAT を試験群とした。対照群として、AD および SDAT のいずれでもない高齢者 59 例 (平均年齢 77 ± 7 歳)、40 例の全身性エリテマトーデス (SLE) 患者、および 60 歳以下の健常人 27 例を使用した。試験群および対照群の血清を検体として ELISA に使用した。AD および SDAT の診断は、DMS-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed., American Psychiatric Association, Washington, D.C., 1994) に従い、また SLE の診断はアメリカリウマチ学会診断基準 (Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of SLE (1997)) に従って行った。

結果

AD と抗 pADPR 抗体および抗 H1 抗体との関係：

抗 pADPR 抗体については、6 例の AD 中 6 例 (100%) が陽性を示した (Fig. 1a)。また SDAT では 20 例中 15 例 (75%) が陽性を示した (Fig. 1b)。また抗 H1 抗体については、AD で 50% (3/6) (Fig. 1a)、SDAT で 65% (13/20) であった (Fig. 1b)。なお抗 H1 陽性者は抗 pADPR 抗体も全て陽性であり、相関係数 (r) は 0.768 となった (Fig. 2a)。一方、抗 pADPR 抗体価が高いことで知られる SLE 患者 [14] 40 症例

で同様の検査を行ったところ、その相関係数は 0.184 となり、有意の差($p < 0.01$)をもって低値を示した(Fig.2b)。

以上の結果は、AD あるいは SDAT 患者の生体内、特に脳でヒストン H1 が pADPR で修飾されていることを示唆するとともに、抗 H1 および抗 pADPR 抗体の産生機構が膠原病 SLE 患者と異なることを示している。さらに特記すべきことは、2~3 の症例で調べた結果、自己抗体のサブクラスが SLE では IgG2、一方 AD/SDAT では IgG1 と IgG2 の両者であった。このことは、AD/SDAT 患者と SLE 患者との間で自己抗体産生機構に差があることをさらに支持するものである。従って、G1/G2 比は診断上有力な指標になると言える。

以下の参考文献は、全体を通して本明細書に組み込まれるものとする。

1. Terryberry JW, Thor G, Peter JB. Autoantibodies in neurodegenerative diseases: antigen-specific frequencies and intrathecal analysis. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 205-216.
2. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain* 1999; 122: 247-253
3. Bolton SJ, Russelakis-Carneiro M, Betmouni S, Perry, VH. Non-nuclear histone H1 is upregulated in neurons and astrocytes in prion and Alzheimer's diseases but not in acute neurodegeneration. *Neuropathol Applied Neurobiol* 1999; 25: 425-432.
4. Hayaishi O, Ueda K. Poly(ADP-ribose) and ADP-ribosylation of proteins. *Ann Rev Biochem* 1977; 46: 95-116
5. Kanai Y, Kawamitsu H, Tanaka M et al. A novel method for purification of poly(ADP-ribose). *J. Biochem* 1980; 88: 917-920
6. Virag L, Suzabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmaceut Rev* 2002; 54: 375-429
7. Kanai Y, Miwa M, Matsushima T, Sugimura T. Studies on poly(adenosine diphosphate ribose) antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 59: 300-306
8. Kanai Y, Sugimura T. Comparative studies on antibodies to poly(ADP-ribose) in rabbits and patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 1981; 43: 101-110.
9. Kanai Y, Sugimura T. Systemic lupus erythematosus. In: ADP-Ribosylation

Reactions. Hayaishi O, Ueda K eds. Academic Press, New York 1982: pp.533-546

10. Szabo C, Dawson VD. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischemia-reperfusion. *TIPS* 1998; 19: 287-298
11. Ellasson MJL, Sampei K, Mandir AS et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Med* 1997; 3: 1089-1095
12. Lindhal T, Satoh M, Poirier GG, Klungland A. Posttranslational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand break. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 404-411
13. Kanai Y, Kawamitsu H, Tanaka M et al. A novel method for purification of poly(ADP-ribose). *J. Biochem* 1980; 88: 917-920
14. Kanai Y, Kawamitsu Y, Miwa M, Matsushima T, Sugimura T. Naturally-occurring antibodies to poly(ADP-ribose) in patients with systemic lupus erythematosus. *Nature* 1977; 265: 175-177

Claims

1. ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストン H1 に対する抗体を検出することを特徴とする、神経系疾患の検出方法。
2. 生体試料が血液である請求項 1 記載の方法。
3. 神経系疾患がアルツハイマー病又はアルツハイマー型痴呆症である請求項 1 記載の方法。
4. 抗体の検出が、IgG1 と IgG2 との比を指標として行われるものである請求項 1 記載の方法。
5. ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストン H1 に対する抗体を検出することを特徴とする、神経系疾患の診断方法。
6. 生体試料が血液である請求項 5 記載の方法。
7. 神経系疾患がアルツハイマー病又はアルツハイマー型痴呆症である請求項 5 記載の方法。
8. 抗体の検出が、IgG1 と IgG2 との比を指標として行われるものである請求項 5 記載の方法。
9. ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 を含む、神経系疾患の診断又は検出用キット。
10. ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 が固相に固定された、神経系疾患の診断又は検出用プレート。
11. 神経系疾患がアルツハイマー病又はアルツハイマー型痴呆症である請求項 9 記載のキット。
12. 神経系疾患がアルツハイマー病又はアルツハイマー型痴呆症である請求項 10 記載のプレート。

Abstract of the Disclosure

本発明は、ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストン H1 に対する抗体を検出することを特徴とする、神経系疾患の検出方法を提供する。

FIG. 1a

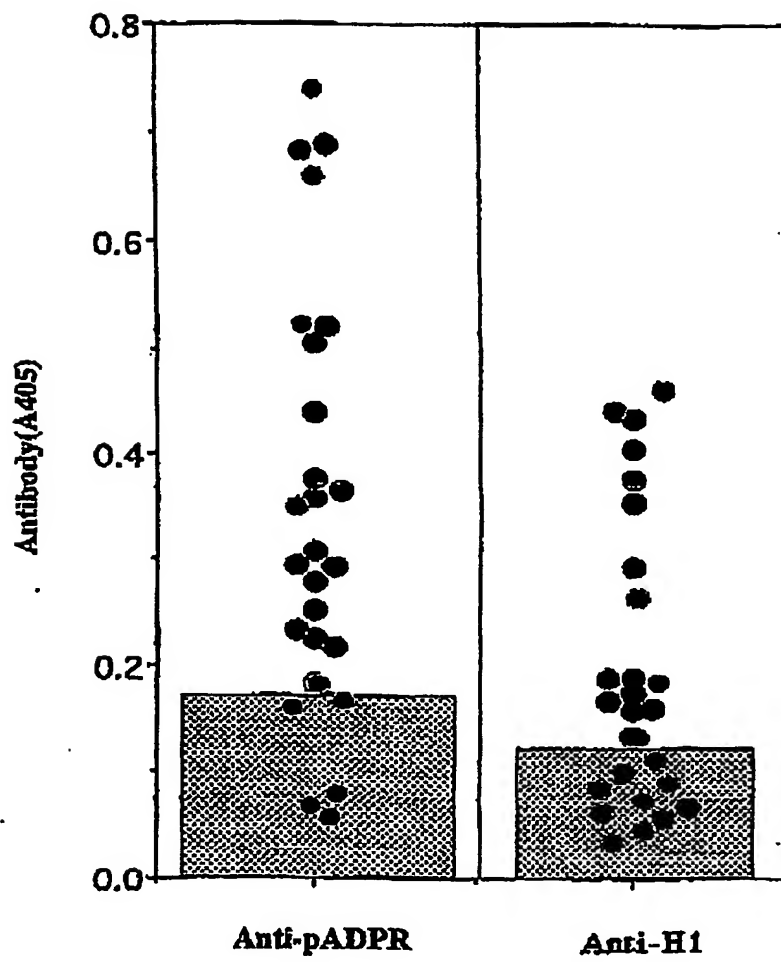
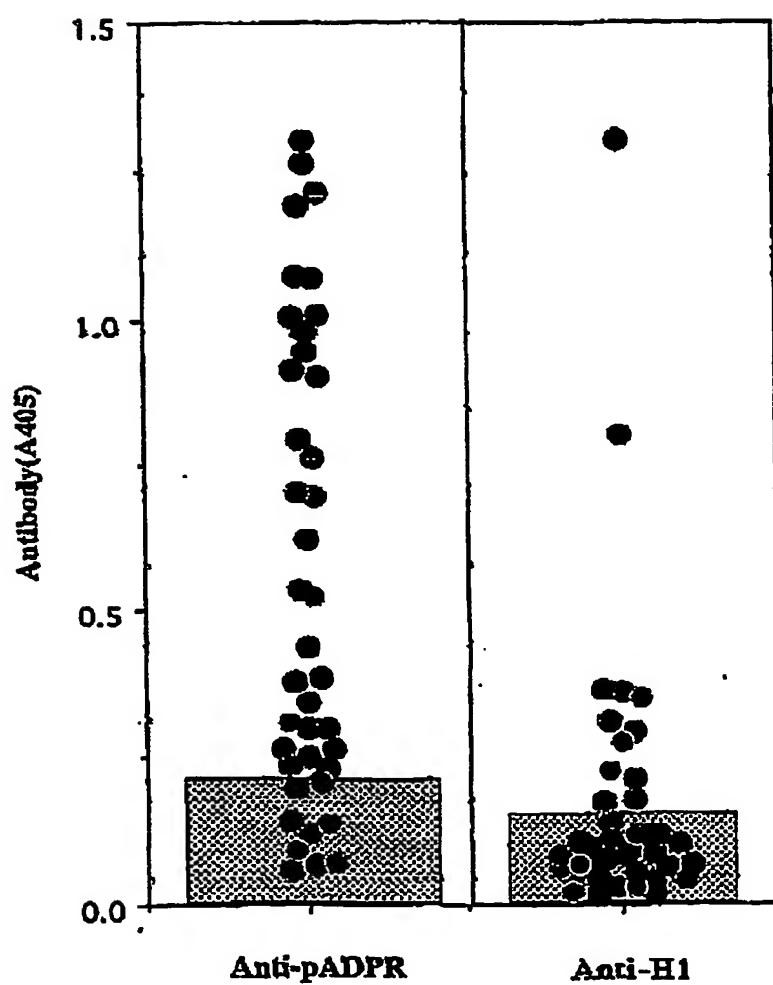


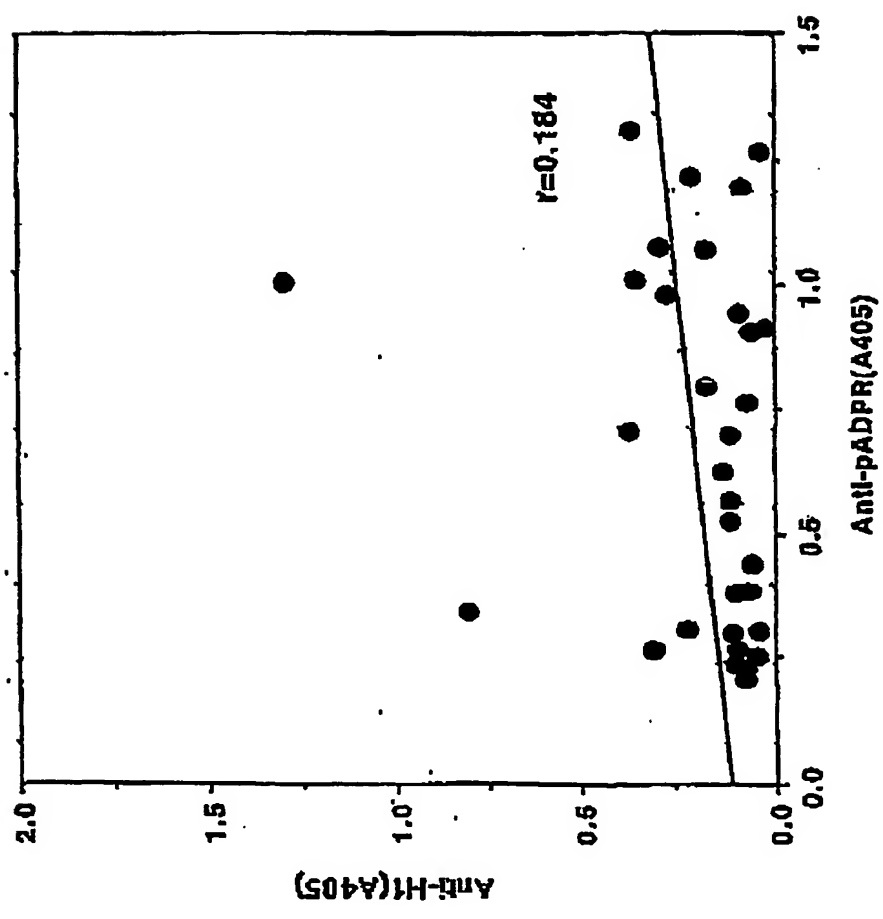
FIG. 1b



A scatter plot showing the correlation between Anti-H1(A405) (Y-axis) and Anti-pADPR(A405) (X-axis). The Y-axis ranges from 0.0 to 0.5, and the X-axis ranges from 0.0 to 0.8. A regression line is drawn through the data points, and the correlation coefficient is indicated as $r=0.768$.

Anti-pADPR(A405)	Anti-H1(A405)
0.05	0.05
0.10	0.08
0.15	0.05
0.20	0.10
0.25	0.08
0.30	0.12
0.35	0.10
0.40	0.15
0.45	0.12
0.50	0.18
0.55	0.15
0.60	0.20
0.65	0.18
0.70	0.22
0.75	0.20
0.80	0.25

FIG. 2b



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.